

## 北海道における土壌から分離された *Bacillus thuringiensis*

——野幌森林公園からの分離株——

菊田 治典<sup>1)</sup>・橋本 明<sup>2)</sup>

坂本与市<sup>3)</sup>・飯塚敏彦<sup>4)</sup>

Isolates of *Bacillus thuringiensis* from the soil in Hokkaido

—Strains from Nopporo forest park—

Harunori KIKUTA<sup>1)</sup>, Akira HASHIMOTO<sup>2)</sup>, Yoichi SAKAMOTO<sup>3)</sup>  
and Toshihiko IIZUKA<sup>4)</sup>

(September, 1989)

### 緒 論

*Bacillus thuringiensis* は土壌中に存在していることが知られており、わが国でも調査報告が多数ある<sup>3,4,5,6)</sup>。しかし、従来の調査は養蚕農家の連作の原因として桑園の土壌あるいは屋内の埃が対象とされ、自然林の土壌が調査された報告は少ない。特に、養蚕農家の少ない北海道においては調査されることがなかった<sup>17)</sup>。

本報は北海道における自然林土壌中の *B. thuringiensis* の分布を明らかにし、併せて優れた殺虫活性を持つ菌株を検索することを目的として、未だ調査の行なわれていない野幌森林公園の土壌を調査した。その結果、いくつかの新しい知見を得たので報告する。

### 材料および試験方法

#### 1) 供試土壌

1987年10月に野幌森林公園内の4地区24地点から土壌を採集(深さ5cm内外)し供試材料とした。すなわち、自然林として保存の良好な二次林、トマンベツ区(以下 Tm) 6地点およびサギの森区(以下 Sg) 6地点お

よび人工林の白樺林区(以下 Sk) 6地点およびミズナラ、クヌギ、カシワ区(以下 Kon) 6地点である。いずれの採集地も堆積物の豊富な pH 5.8 程度の肥沃な土壌であった。

#### 2) *B. thuringiensis* の分離

*B. thuringiensis* の分離は菊田ら<sup>17)</sup>に従った。

#### 3) 電子顕微鏡用試料の作成

走査電子顕微鏡観察のための方法は菊田ら<sup>17)</sup>に従った。

#### 4) 結晶タンパク質の精製

*B. thuringiensis* 結晶タンパク質は菊田ら<sup>17)</sup>に従い精製した。

#### 5) カイコに対する殺虫活性試験

分離された *B. thuringiensis* のカイコに対する殺虫活性は1989年6月上旬に、菊田ら<sup>17)</sup>の方法に従って調べた。供試カイコは北海道大学農学部蚕学教室保存の日140号×支140号の5齢起蚕とした。

#### 6) SDS-polyacrylamide gel (7.5% gel) 電気泳動法 (SDS-PAGE)

SDS-PAGEにおける試料の調整は *B. thuringiensis*

1) 北海道文理科大学

Laboratory of Experimental Farm, Hokkaido College of Arts and Science, Ebetsu 069, Japan.

2) 京都府綴喜郡田辺町田辺道場 30

3) 北海道文理科大学

Laboratory of Applied Entomology, Hokkaido College of Arts and Science, Ebetsu 069, Japan.

4) 北海道大学農学部蚕学講座

Laboratory of Sericology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan.

5) 本研究は、栗林育英学術財団の研究助成を受けた。

の粉末 5 mg に 2% 2-MeEtOH 0.5 ml を加え浮遊混和させ pH 10.0 に調整した後、水中に 30 分間放置した。これに 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) を 50  $\mu$ l 加え 6 M HCl で pH 8.0 に調整の後 10% SDS を 125  $\mu$ l 加え 98°C 2 分間加熱して SDS-PAGE に供した。なお本実験には簡便法であるミニプロティアン II (通称ミニゲル) を用い、泳動時間の短縮をはかった。すなわち、電気泳動用試料 (4  $\mu$ l) は等量の sample buffer (62 mM Tris (pH 8.0), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue) と混合し、150 V で約 1.5 時間泳動した。この際、タンパク質分子量の指標として Bio-Rad 社の Molecular Weight Standard-High を用いた。電気泳動後の gel は染色液 (0.1% coomassie blue R-250, 7.5% acetic acid, 40% methanol) で 40 分間染色の後、脱色液 (10% acetic acid, 45% methanol) で脱色し泳動パターンを観察した。

### 結果および考察

本試験で分離された菌株数は Sg 区の 3 地点から 6 株、Tm 区の 3 地点から 25 株、Sk 区の 3 地点から 4 株、Kon 区の 1 地点から 1 株、計 36 株であった。

分離された菌株数は Tm 区が全体の 69% でもっとも多く、その他の 3 地区では著しく少なく、両者に顕著な差が見られた。すなわち、人工林より自然林として保存の良好な Tm 区での分離菌株数が多かった。

自然環境中における *B. thuringiensis* は、通常土壤中に芽胞の状態で存在していると考えられ、実際に本菌は養蚕農家の塵埃および土壤に広く分布することが報告されている<sup>1,12,14,15,17</sup>。しかし、土壤中の *B. thuringiensis* は発芽が困難であり、また、発芽が認められても栄養条件の不足ならびに土壤微生物との競合のために、栄養細胞の増殖が起こりにくいとされている<sup>7,19,21,22</sup>。

一方、*B. thuringiensis* は昆虫死体等で発芽・増殖し芽胞の再形成をすることがカイコ、アメリカシロヒトリ、マイマイガなどによって明らかにされている<sup>2,6,13,16,18</sup>。また、関島ら (1977)<sup>19</sup> は *B. thuringiensis* を土壤へ散布した場合、14 カ月後においても検出されることを報告している。

これらの結果は *B. thuringiensis* が土壤中において芽胞の状態で存在し、徐々に活性を失いつつも長期間存続することを示唆している。したがって、土壤中の *B. thuringiensis* は昆虫死体など限られた場と機会を利用して発芽・増殖し芽胞の再形成を行い、最終的には土壤に到達すると考えられるが、同時に *B. thuringiensis* は土壤中においてスポット的に分布していることが想像さ

れる。本試験で Tm 2 地点で著しく多く分離されたことは、自然環境の中でこれらを裏づける結果と考えられた。

本試験で分離された各菌株の結晶形態を走査電子顕微鏡で観察し Fig. 1~5 に示した。飯塚ら (1982)<sup>9</sup> は *B. thuringiensis* の 23 亜種を走査電子顕微鏡で観察し、結晶タンパク質は bipyrarnidal, cuboidal, irregular 結晶の単体またはそれらの組合わせによって構成されており、各亜種の識別が可能であることを示唆した。本試験においても従来報告と特に異なる結晶形態は観察されず、bipyrarnidal, cuboidal, irregular 結晶の単体またはそれらの組合わせによって構成されていた。

分離菌株のカイコ 5 齢幼虫に対する殺虫活性試験の結果を Table 1 に示した。これら 36 菌株は結晶形態と殺虫活性試験の結果にもとづき 5 グループに大別された。なお、これら 36 株の中、Sg 5-7 は H-serotype による従来の分類方法によって *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*, Sg 5-9 は *B. thuringiensis* subsp. *indiana* と同定された<sup>11</sup>。

グループ 1 は bipyrarnidal 形の結晶を有しカイコに殺虫活性を示さない群である。これらの菌株の結晶形態は極めて近似していた。しかし、この中の Sg 5-7 は *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*, Sg 5-9 は *B. thuringiensis* subsp. *indiana* とすでに同定されているので、SDS-PAGE による結晶タンパク質の解析を行ない Sg 5-7 および Sg 5-9 との比較を試みた。その結果 Sg 3-1, Sg 3-3 は SDS-PAGE 泳動パターンが Sg 5-7 と一致し *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* と同定された。*B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* および *B. thuringiensis* subsp. *indiana* では殺虫活性を示さないことが知られており<sup>17</sup>、それらの報告と一致した。

グループ 2 はやや形が崩れた bipyrarnidal 形の結晶形態を有し、カイコに対する殺虫活性の強い群である。これらの SDS-PAGE 解析の結果は Fig. 6 に示した。この群は *B. thuringiensis* subsp. *reuhensis* と同定され、カイコに強い殺虫活性を有するとする報告<sup>9</sup> と一致した。

グループ 3 は bipyrarnidal 形結晶と cuboidal 形結晶を混在する群である。この群は *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 および *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* が知られている<sup>8</sup>。これら菌株の SDS-PAGE 解析の結果 (Fig. 7-1~7-2) は Tm 2-35, Tm 2-37, Tm 2-38, Tm 3-7 および Tm 3-13 以外は *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 に一致した。これらの菌株は本

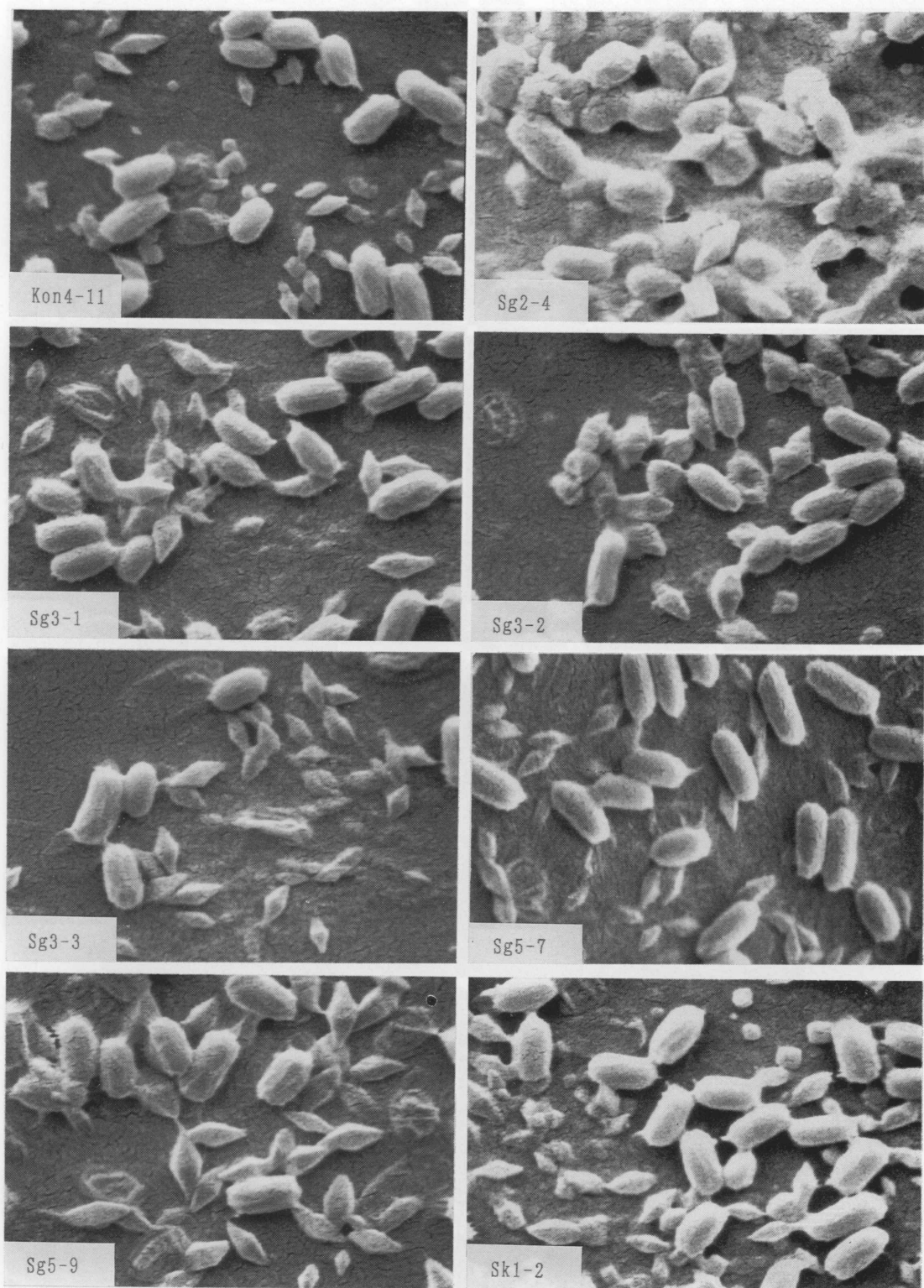


Fig. 1. Each photograph indicates spore and rcystal in the isolates of *B. thuringiensis*. ( $\times 10,000$ )

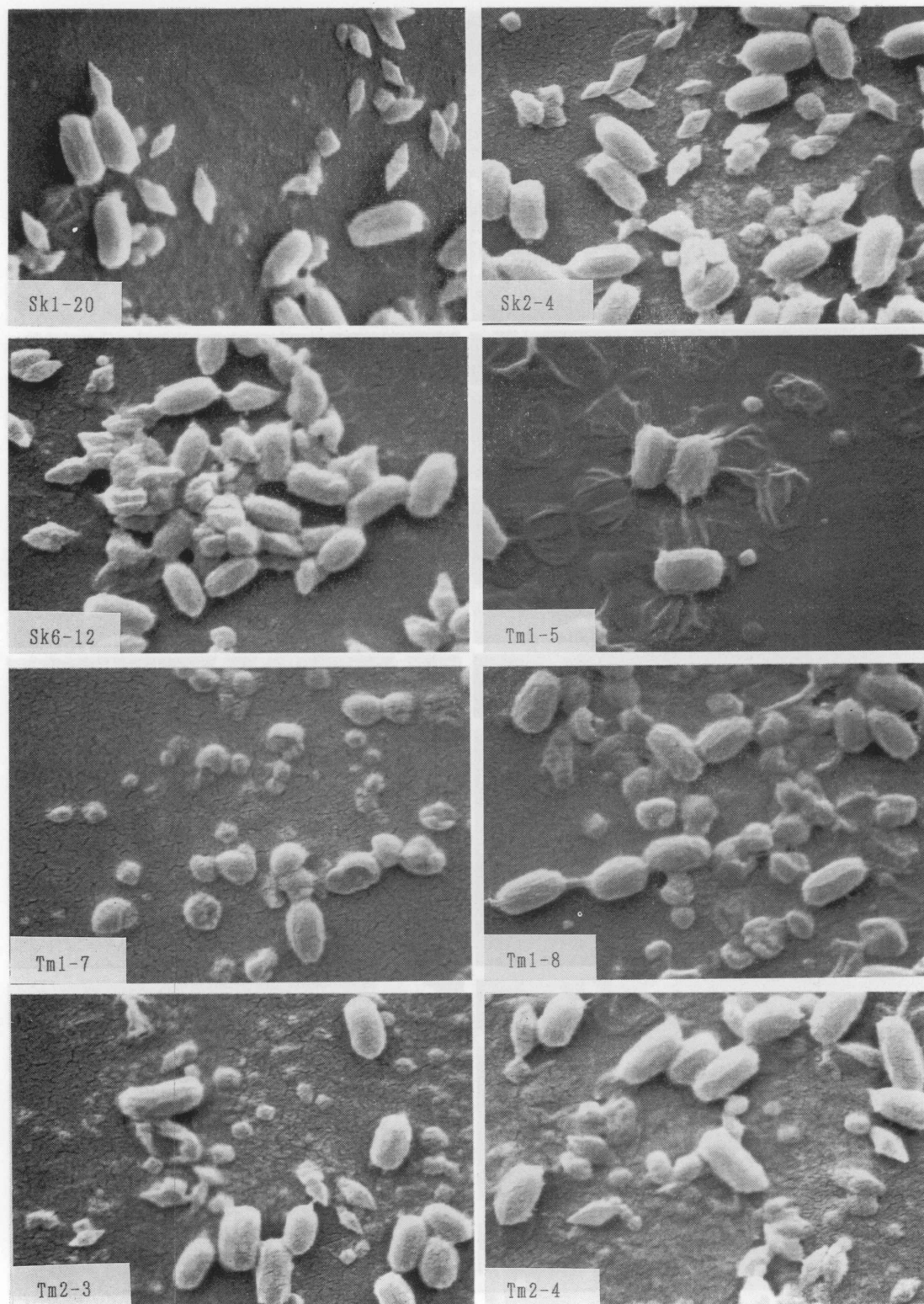
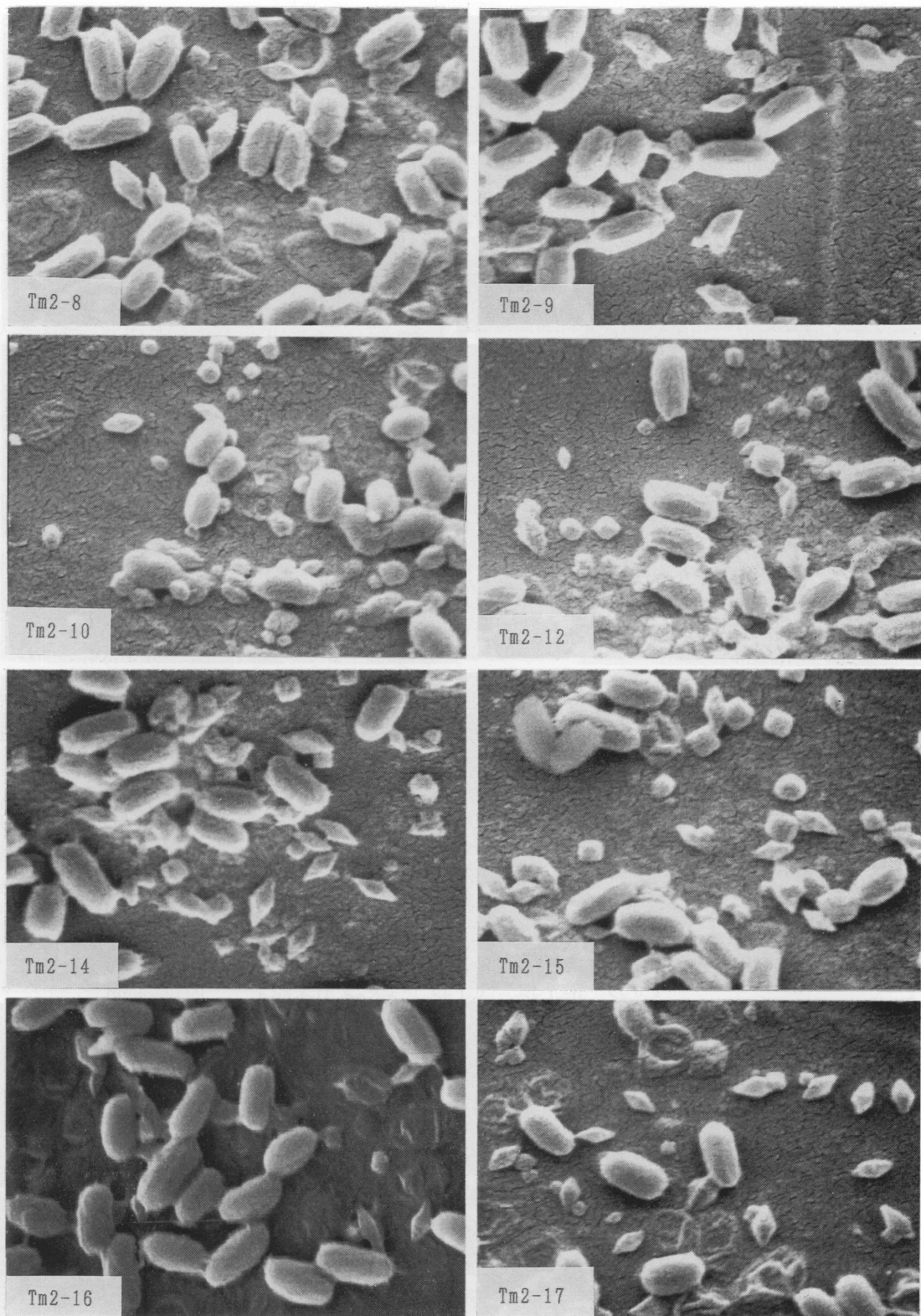


Fig. 2. Each photograph indicates spore and crystal in the isolates of *B. thuringiensis*. ( $\times 10,000$ )





**Fig. 3.** Each photograph indicates spore and crystal in the isolates of *B. thuringiensis*. ( $\times 10,000$ )

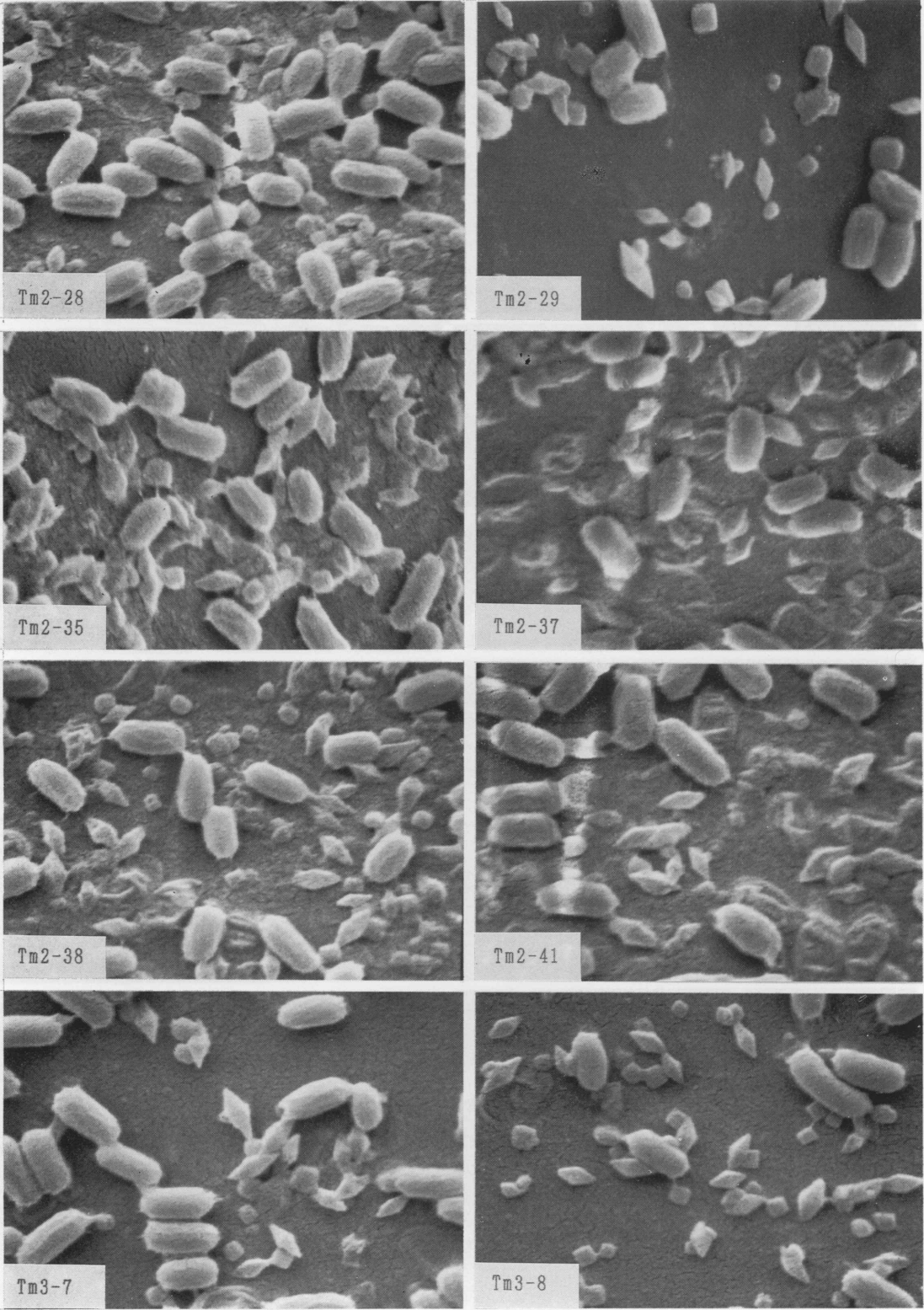


Fig. 4. Each photograph indicates spore and crystal in the isolates of *B. thuringiensis*. (×10,000)

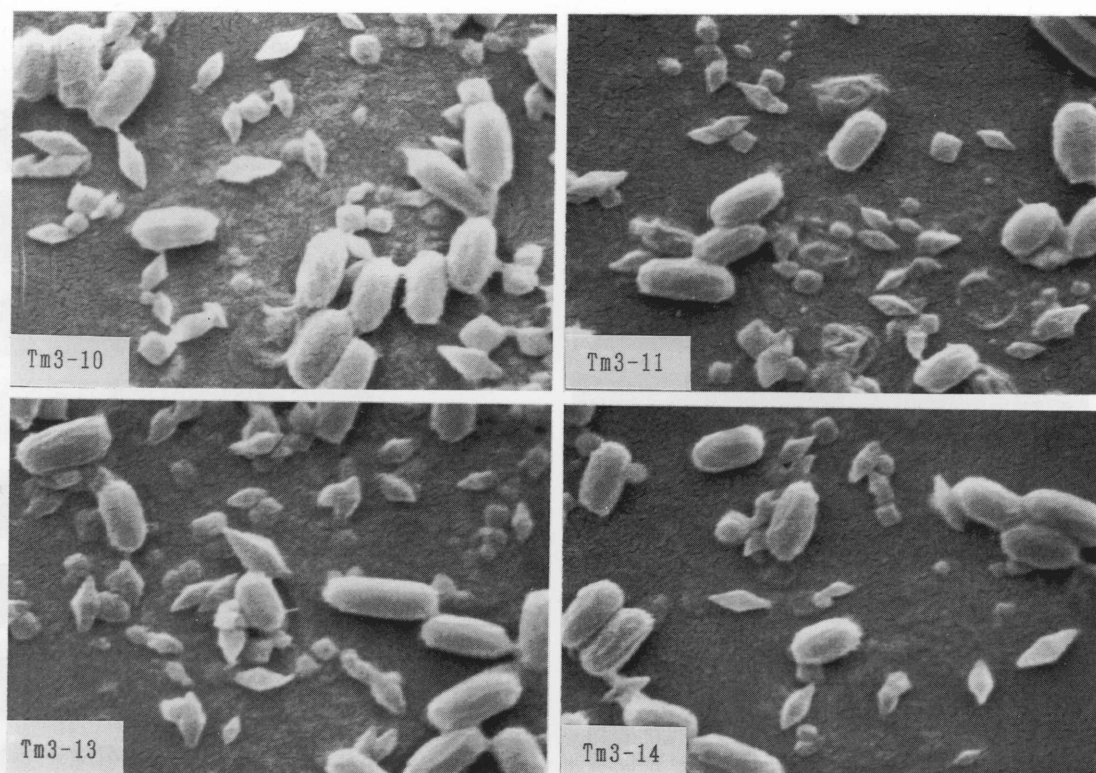


Fig. 5. Each photograph indicates spore and crystal in the isolates of *B. thuringiensis*. ( $\times 10,000$ )

Table 1. Classification of isolates in *Bacillus thuringiensis* from soil at Nopporo forest park

| Group | Crystal shape                       | Strains  |         |         |         |         | Number of strains | Toxic activity  |
|-------|-------------------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|-------------------|---|
| 1     | bipyramidal & non-toxic             | Sg 3-1   | Sg 3-3  | Sg 5-7* |         |         | 3                 | (-)   |
|       |                                     | Sg 5-9** |         |         |         |         | 1                 | (-)   |
| 2     | collapsed bipyramidal & toxic       | Sg 3-2   | Sk 6-12 |         |         |         | 2                 | $10\text{ }\mu\text{g}<\text{LD }50<1\text{ }\mu\text{g}$ |
| 3     | bipyramidal & cuboidal & toxic      | Kon 4-11 | Sg 2-4  | Sk 1-2  | Sk 1-20 | Sk 2-4  | 21                | $10\text{ }\mu\text{g}<\text{LD }50<1\text{ }\mu\text{g}$ |
|       |                                     | Tm 2-3   | Tm 2-4  | Tm 2-8  | Tm 2-9  | Tm 2-12 |                   |   |
|       |                                     | Tm 2-14  | Tm 2-15 | Tm 2-16 | Tm 2-17 | Tm 2-28 |                   |   |
|       |                                     | Tm 2-29  | Tm 2-41 | Tm 3-8  | Tm 3-10 | Tm 3-11 |                   |   |
|       |                                     | Tm 3-14  |         |         |         |         |                   |   |
|       | untypable                           | Tm 2-35  | Tm 2-37 | Tm 2-38 | Tm 3-7  | Tm 3-13 | 5                 | $10\text{ }\mu\text{g}<\text{LD }50<1\text{ }\mu\text{g}$ |
| 4     | bipyramidal & irregular & non-toxic | Tm 2-10  |         |         |         |         | 1                 | (-)   |
| 5     | irregular & non-toxic               | Tm 1-5   | Tm 1-7  | Tm 1-8  |         |         | 3                 | (-)   |

\* Sg 5-7 was identified as subsp. *kumamotoensis* by H-serotype.

\*\* Sg 5-9 was identified as subsp. *indiana* by H-serotype.



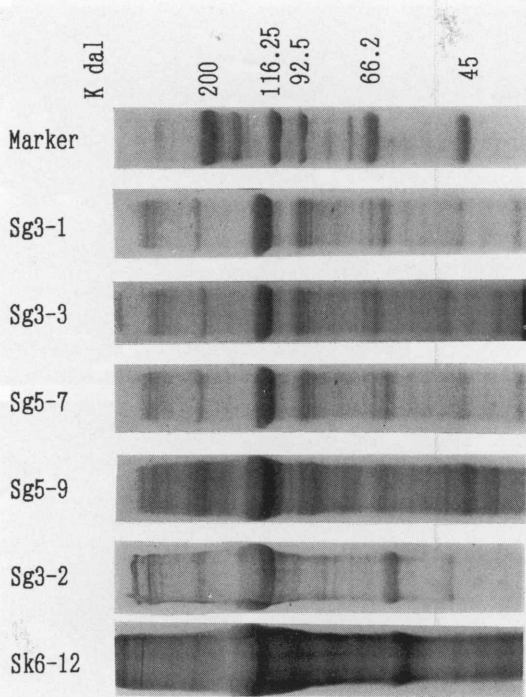


Fig. 6. Analysis of crystal protein in isolates by sodium dedecyl sulfate (SDS-polyacryl amide gel electrophoresis (PAGE)).

試験で分離された菌株数の72%で最も大きいグループとなった。

このグループにおいて特に注目すべき点は Tm 2-35, Tm 2-37, Tm 2-38, Tm 3-7, Tm 3-13 は従来 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 に認められる bipyramidal 形結晶と cuboidal 形結晶との割合 (約7:3)<sup>23)</sup> に比較し cuboidal 形結晶の割合が多いことである。すなわち、飯塚・菊田<sup>10)</sup> はマツカレハ大発生地の北海道富良野町で死亡幼虫および森林土壌から *B. thuringiensis* を分離し、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 の中には bipyramidal 形結晶と cuboidal 形結晶の割合が従来の知見と異なる株があることを示唆した報告を裏付ける結果となった。

グループ4は bipyramidal 形結晶と irregular 形結晶が混在しカイコに殺虫活性を有さない群である。グループ5は irregular 形結晶だけを有し、カイコに殺虫活性を有しない群である。これらグループ4とグループ5の各菌株は SDS-PAGE 解析の結果、上記のいずれにも属さないため未同定とした。

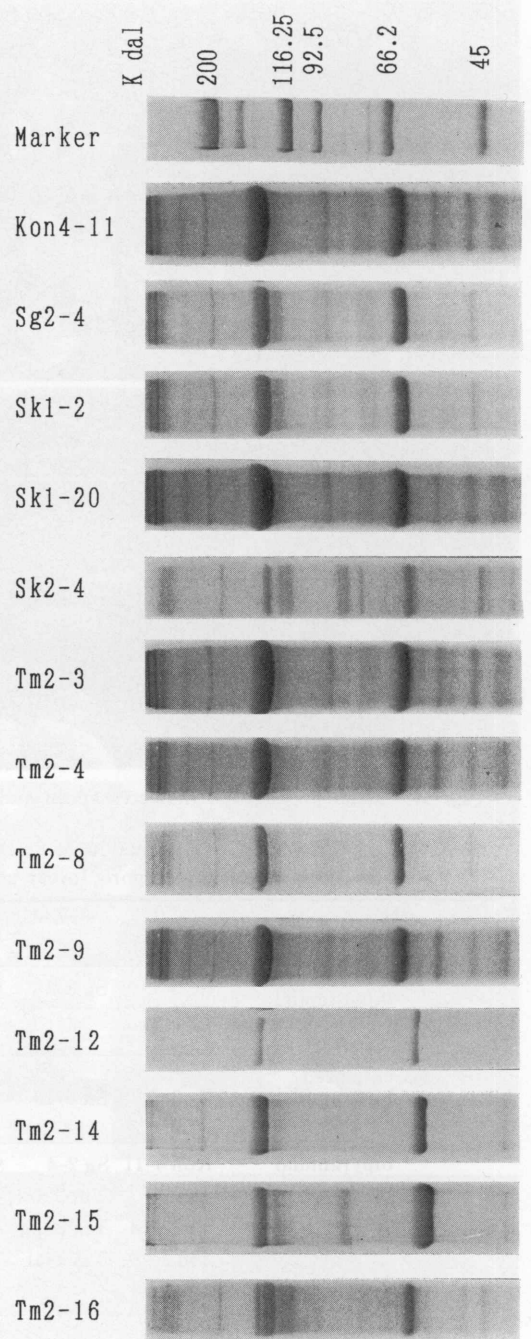


Fig. 7-1. Analysis of crystal protein in the isolates by SDS-PAGE.

### 要 約

1) 野幌森林公園の4区24地点の土壌から36株の *Bacillus thuringiensis* が分離された。概して自然環境



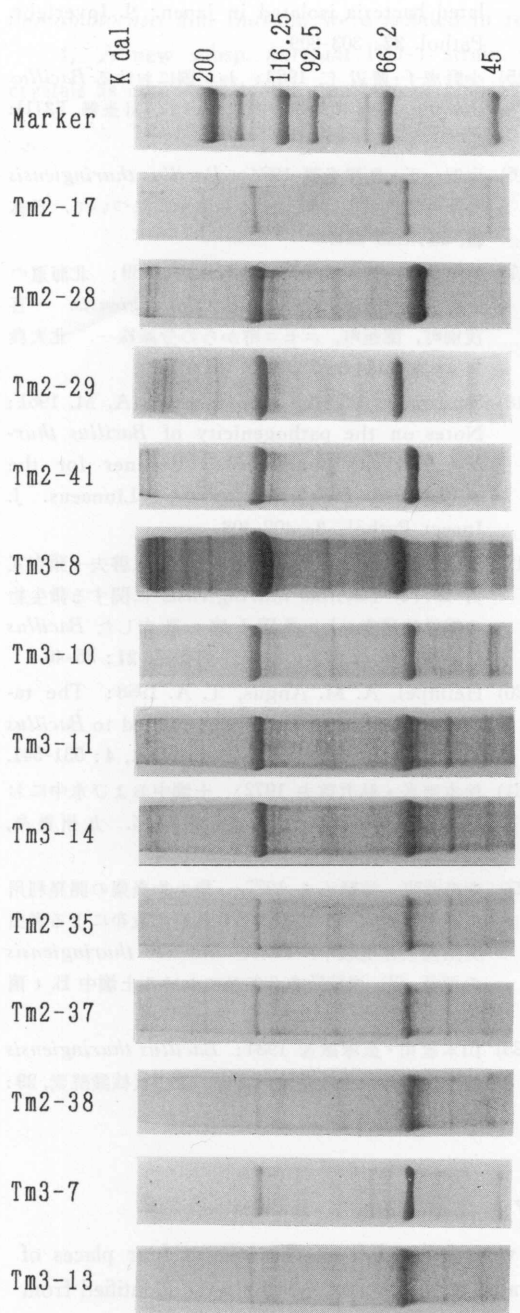


Fig. 7-2. Analysis of crystal protein in the isolates by SDS-PAGE.

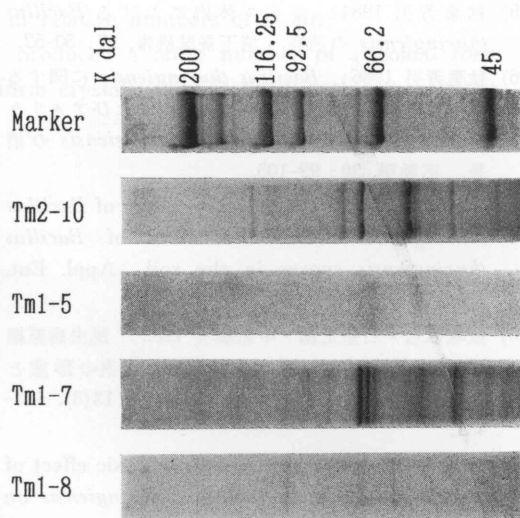


Fig. 8. Analysis of crystal protein in the isolates by SDS-PAGE.

および SDS-PAGE による結晶タンパク質の解析で細分され 7 タイプとされた。

3) Tm 区から分離された *B. thuringiensis* は bi-pyramidal と cuboidal 結晶を共有する *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 タイプが最も多く分離され、Sg 区から分離された *B. thuringiensis* は、subsp. *kumamotoensis* および subsp. *indiana* が優占していた。

4) bi-pyramidal と cuboidal 結晶を共有する *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 タイプの中で cuboidal 結晶の産生割合が多い新しい菌株が分離された。

## 文 献

- 1) 鮎沢啓夫・高須敏夫・倉田啓而 1961: 養蚕農家の塵埃より *Bacillus thuringiensis* の分離。日蚕雑, 30: 451-455.
- 2) 鮎沢啓夫・藤吉宣男 1964: 蚕死体における *Bacillus thuringiensis* の増殖。日蚕雑, 33: 399-402.
- 3) 秋葉芳男・関島安隆・鮎沢啓夫・藤吉宣男 1977: *Bacillus thuringiensis* に関する微生物生態学的研究 II. 滅菌土壌中における *Bacillus thuringiensis* 菌数の消長。応動昆, 21: 41-46.
- 4) 秋葉芳男・関島安隆・鮎沢啓夫・藤吉宣男 1979: *Bacillus thuringiensis* に関する微生物生態学的研究 III. 土壌抽出液における *Bacillus thuringiensis* の増殖と抽出液 pH との関係。応動昆, 23: 220-223.

がよく保存されている地区から多くの菌株が得られた。

2) 分離された *B. thuringiensis* は走査電子顕微鏡で結晶形態が観察され、結晶形態およびその組成で 5 タイプに大別された。更に、カイコによる殺虫活性試験お

- 5) 秋葉芳男 1984: ミミズ体内における *Bacillus thuringiensis* の消長. 埼玉蚕試研報, **57**: 50-52.
- 6) 秋葉芳男 1986: *Bacillus thuringiensis* に関する微生物生態学的研究 VII. カイコおよびアメリカシロシトリの体内における *B. thuringiensis* の消長. 応動昆, **30**: 99-105.
- 7) Akiba, Y., 1986: Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis* VI. Germination of *Bacillus thuringiensis* spores in the soil. Appl. Ent. Zool. **21** (1): 76-80.
- 8) 飯塚敏彦・石埜正徳・中島敏夫 1982: 昆虫病原細菌 *Bacillus thuringiensis* の結晶性毒素の形態とプラスミド DNA. 北大農邦文紀要, **13** (3): 423-431.
- 9) Iizuka, T., and Goto, C., 1987: Toxic effect of crystal protein from *Bacillus thuringiensis* on *Bombyx mori* and *Mamestra brassicae*. J. Asericult. Sci. (Japan) **56** (5): 379-384.
- 10) 飯塚敏彦・菊田治典 1987: 山部町から分離された *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 系数株の特性. 昭和 62 年度応動昆・昆虫学会北海道支部大会講演要旨.
- 11) Iizuka, T., Asano, S., Kikuta, H. and Ohba, M. 1989: Identification and characterization of non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* against the silkworm. Proc. of XXII Annual Meeting of SIP. 32.
- 12) 石川義文・林田 勉・井川 晃 1964: 愛知県の養蚕家のほこりから *Bacillus thuringiensis* の検索. 日蚕雑, **33**: 480-483.
- 13) 内海 進 1965: 蚕児における *Bacillus thuringiensis* の保菌現象ならびに増殖. 京都工繊大繊維学報, **4**: 278-284, 1965.
- 14) Ohba, M., and Aizawa, K., 1978: Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. Invertebr. Pathol. **32**: 303-309.
- 15) 小野恵子・渡辺 仁 1983: わが国における *Bacillus thuringiensis* の地域分布について. 日蚕雑, **52** (1): 47-50.
- 16) 片桐一正・島津光明 1974: *Bacillus thuringiensis* の野外昆虫病死体における芽胞形成について. 日林雑, **56**: 325-331.
- 17) 菊田治典・浅野真一郎・飯塚敏彦 1989: 北海道の土壌から分離された *Bacillus thuringiensis*. 一喜茂別町, 蘭越町, ニセコ町からの分離株一. 北大農邦文紀要, **16** (4): 383-389.
- 18) Smironoff, W. A. and Heimpel, A. M. 1961: Notes on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner for the earthworm, *Lumbricus terrestris* Linnaeus. J. Insect Pathol., **3**: 403-408.
- 19) 関島安隆・秋葉芳男・小野恵子・鮎沢啓夫・藤吉宣男 1977: *Bacillus thuringiensis* に関する微生物生態学的研究 I. 桑園土壌へ散布した *Bacillus thuringiensis* 菌数の消長. 応動昆, **21**: 35-40.
- 20) Heimpel, A. M. Angus, T. A. 1958: The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* F and F., Can. J. Microbiol., **4**: 531-541.
- 21) 松本奎吾・鮎沢啓夫 1972: 土壌中および水中における *Bacillus thuringiensis* の生存. 九州蚕糸, No. 3.
- 22) 森田芳昭・楠野正夫 1977: 微生物農薬の開発利用に関する研究 第 12 報. BT 剤連続散布による害虫防除効果と土壌中における *Bacillus thuringiensis* の消長 (3) 連続散布 3 年目における土壌中 *B. t* 菌消長. 東京蚕糸試験要報, **11**: 29-38.
- 23) 山本敬司・飯塚敏彦 1984: *Bacillus thuringiensis* の生産する殺虫性菌体内毒素. 蛋白質核酸酵素, **29**: 444-454.

## Summary

1) Thirty six strains of *Bacillus thuringiensis* were isolated from the soils at four places of Nopporo forest park. Generally speaking, a considerable of number of isolates were identified from the points where natural conditions were preserved from the point of substitution forest.

2) Crystals of isolates of *B. thuringiensis* were observed by scanning electron microscope and were eventually classified into groups depending on the shape of the crystals.

According to the toxic activity against the silkworm and analysis of crystal protein by SDS-PAGE, these isolates were classified into seven groups.

3) Subsp. *kurstaki* HD-1 strains from Tm point at which natural conditions were preserved, were isolated predominantly. At Sg point which was in a cultivated forest, non-toxic subsp.

*kumamotoensis* and *indiana* were isolated in related in relative numbers of strain.

4) A new subsp. *kurstaki* HD-1 strain which produced a large number of cuboidal form crystals as compared to the numbers of bipyramidal form crystals, were isolated in this experiment.